

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年1月8日 (08.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/002527 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 39/395, 35/74, A61P 33/02, A23K 1/18, 1/16 阜市佐野 839番地 1 株式会社ゲン・コーポレーション 免疫研究所内 Gifu (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008132 (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3階 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2003年6月26日 (26.06.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) 優先権データ: 特願2002-189137 2002年6月28日 (28.06.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ゲン・コーポレーション (GHEN CORPORATION) [JP/JP]; 〒501-1132 岐阜県岐阜市折立 296番地 1 Gifu (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 兒玉 義勝 (KODAMA, Yoshikatsu) [JP/JP]; 〒501-1101 岐阜県岐阜市佐野 839番地 1 株式会社ゲン・コーポレーション 免疫研究所内 Gifu (JP). 横山 英明 (YOKOYAMA, Hideaki) [JP/JP]; 〒501-1101 岐阜県岐阜市佐野 839番地 1 株式会社ゲン・コーポレーション 免疫研究所内 Gifu (JP). ヌグエン サー・バン (NGUYEN, Sa van) [VN/JP]; 〒501-1101 岐阜県岐阜市佐野 839番地 1 株式会社ゲン・コーポレーション 免疫研究所内 Gifu (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: COMPOSITIONS AGAINST CHICKEN COCCIDIOSIS

(54) 発明の名称: 抗鶏コクシジウム症組成物

(57) Abstract: A method of preventing or treating chicken coccidiosis which comprises orally administering to avians an antibody obtained from a chicken egg immunized with an outer membrane protein antigen having an immunogenicity common to sporozoites and merozoites of *Eimeria acervulina*, *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* participating in chicken coccidiosis or an immunogenic fragment thereof, optionally together with a lactic acid bacterium and/or another antibody obtained from a chicken egg immunized with *Clostridium perfringens*.

(57) 要約: 本発明は、鶏コクシジウム症に関与する *Eimeria acervulina*、*Eimeria tenella* 及び *Eimeria maxima* のスポロゾイト及びメロゾイトに共通の免疫原性を有する外膜蛋白質抗原又はその免疫原性断片で免疫された鶏の卵より得られた抗体、又は該抗体と、乳酸菌及び/又はクロストリジウム・パーフリンジェンスで免疫された鶏の卵より得た抗体とを鳥類に経口投与することにより鶏コクシジウム症を予防又は治療する方法に関する。

明 細 書

抗鶏コクシジウム症組成物

5 技術分野

本発明は、鶏コクシジウム症の予防及び治療に有効な組成物に関する。更に詳しくは、鶏などの鳥類の鶏コクシジウム症に対して優れた予防効果及び治療効果を有し、鶏コクシジウム症からの感染防御や鶏コクシジウム症に伴う体重減少といった臨床症状の改善、又は鶏コクシジウム症の治療に極めて有効な組成物に関する。

背景技術

鶏コクシジウム症 (coccidiosis in chickens) はアイメリア (*Eimeria*) 属の原虫の感染によって起こる。鶏では寄生のアイメリア属は種によって症状、寄生部位、病変が異なる。特に病原体として重視されているものは、*Eimeria tenella*、*E. necatrix*、*E. maxima*、*E. brunetti*、*E. acervulina*の5種類で、他に*E. mitis*、*E. praecox*、*E. hagani*、*E. mivati*などが知られている。鶉では*E. uzura*、*E. tsunodai*など、七面鳥では*E. meleagrimitis*、*E. adenoides*、*E. gallopovonis*など、ほろほろ鳥では*E. grenieri*、*E. numidae*などの感染により起こることが知られている。鶏の疾病のなかで最も被害が大きいものの一つである。オーシストの経口的摂取によって感染が成立する。種々の下痢、食欲不振、廃絶、体重減少などの症状を呈し、死亡も認められる。鶏の日齢、性別、品種に関係なく発生する。平飼いの鶏舎で発生しやすいが、近年多段式ケージの採卵鶏でも発生が報告されている。また、クロストリジウム・パーフリンジェンス (*Clostridium perfringens*) との混合感染により症状は重篤化する。オーシストによる鶏舎の汚染防止やコクシジウム予防剤の使用で対応する。予防には、各種合成抗鶏コクシジウム剤及びイオノフォラス抗生物質がコクシジウム予防剤として使用できる。治療には、サルファ剤又はサルファ剤とピリミジン系薬剤との合剤が用いられる。ワクチンも実用化されている。

鶏は孵化後10週間以内しかコクシジウム予防剤を使用できず、またブロイラーでは出荷前7日間の休薬期間が義務づけられている。これは、投薬した場合、一定期間は卵、肉の出荷が禁止されているためである。このコクシジウム予防剤の使用できない期間に鶏コクシジウム症が発生しやすい。更に、薬剤耐性鶏コクシジウムが増加しているため各農場に有効な予防剤を選択する必要がある。鶏コクシジウム症のコクシジウム予防剤は一時期極めて多くのものが開発されたが、その後、残留、人間を含む他の生物への悪影響、薬剤耐性鶏コクシジウムの出現などにより、使用できなくなっている。欧州では2007年以降コクシジウム予防剤の使用が禁止になる。わが国でも飼料添加物に対する規制法が実施されてから、その使用は著しく制限されるようになった。

生ワクチンは、経口投与するもので、病原性の弱い種類で計画免疫し、強毒種の感染を防止しようとする試みがなされている。また、数種類のオーシストの混合したものを雛に与えて、死亡しない程度に感染させ免疫を得させようとする鶏コクシジウム生ワクチンは、実際的には養鶏場が汚染されるので、むしろマイナスの点が多い。不活化ワクチンでは感染阻止抗体の産生が低く、また効果も低い。また、ワクチンを雛に免疫しても感染防御抗体が産生されるまでに数週間かかるため、ブロイラーにおける利用価値は低い。

一方、鶏コクシジウム症になると腸内の菌叢が崩れ、下痢などの症状を引き起こし、特に下痢は長期に亘る。また、これにより体力が消耗し、免疫力が低下することにより壊死性腸炎にかかりやすくなる。

特許第2548115号、特許第2698778号、特許第2698779号のトリ抗体を用いた哺乳動物の受動免疫化は、受動免疫のための異種抗体（鶏卵由来）を投与（特に、注射などの非経口投与）する際に、アナフィラキシーショックや血清病などが起こるのを防止するため、予防、治療のための抗体投与の前に予め、抗体を含有する食物を哺乳動物に与えておき経口免疫耐性（免疫寛容）の状態にしておくものであり、本発明の経口受動免疫防御効果とは全く着想は異なる。また、本発明者らは、ブタの大腸菌症の原因となる腸管毒素原性大腸菌の987P、K88及びK99抗原、及びウシの大腸菌症の原因となる腸管毒素原性大腸菌のK99抗原のいずれか1種以上の抗原で鶏を免疫し、この免疫鶏が産生した卵の少なくとも卵黄を含む部分か

- ら抗体を回収することにより得られる、前記抗原に特異的なポリクローナル抗体を含有する、ブタ又はウシの哺乳期における大腸菌症の経口予防剤及び治療剤（特許第2034005号）や、予め食中毒菌を接種した鶏が免疫獲得後に産生した卵の全卵、卵黄もしくは抗体含有画分からなり、該食中毒菌に特異的な抗体を含有する、食鳥の食中毒菌抑制材料（特許第2615673号）について出願している。これらは、鶏卵抗体の有用性を示しているが、細菌に対する鶏卵抗体の経口受動免疫防御効果を示したもので、原虫に対する防御効果は提示していない。現在でも、細菌又はウイルスなどに対する経口受動免疫能の考え方はあるが、原虫に対する経口受動免疫能の考え方は示されていない。
- 10 一方、鶏コクシジウム症の各種抗原を用いたワクチンに対する報告は多数あるが、受動免疫を用いた報告は少ない。鶏コクシジウムの*Eimeria maxima*の gametocytesに対するマウスモノクローナル抗体を作製し、鶏コクシジウム症における受動免疫を確認した論文 (*Infection and Immunity*, 56: 972-976, 1988、*Infection and Immunity*, 58: 557-562, 1990) があるが、マウスモノクローナル
- 15 抗体を経口でなく静脈内注射する投与方法で試験を行っており、全く実用的でない。

発明の開示

- 本発明者らは前記の問題点を解決すべく鋭意検討した結果、鶏コクシジウム症
- 20 に関与する*Eimeria acervulina*、*Eimeria tenella*及び*Eimeria maxima*のスポロゾイト及びメロゾイトに共通の免疫原性を有する外膜蛋白質抗原又はその免疫原性断片を抗原として鶏、鶉又は他の鳥類を免疫して得られた卵に含まれる抗鶏コクシジウム症抗体を鶏などの鳥類に投与することにより、アイメリア属のスポロゾイト又はメロゾイトに抗体が付着し、スポロゾイト又はメロゾイトが上皮細胞
- 25 に付着及び侵入するのを阻止することにより、その病原性を消失せしめることを見出した。更に、本抗鶏コクシジウム症抗体を投与するに際して乳酸菌を併せて給与することによって、腸内菌叢の改善や免疫増強と同時に本抗体がより有効に作用し、鶏コクシジウム症の予防及び治療に優れた効果を発揮することを見出した。また、本抗鶏コクシジウム症抗体を投与するに際してクロストリジウム・パ

ーフリンジェンスで免疫された鶏の卵より得た抗体を併せて給与することによって、クロストリジウム・パーフリンジェンスとの混合感染による症状の重篤化を抑えることにより本抗体がより有効に作用し、鶏コクシジウム症の予防及び治療に優れた効果を発揮することを見出し、発明を完成するに至った。

5 本発明は、以下の発明を包含する。

(1) 鶏コクシジウム症に関与する*Eimeria acervulina*、*Eimeria tenella*及び*Eimeria maxima*のスποロゾイト及びメロゾイトに共通の免疫原性を有する外膜蛋白質抗原又はその免疫原性断片で免疫された鶏の卵より得られた抗体を含有する経口用抗鶏コクシジウム症組成物。

10 (2) 更に、乳酸菌を含有する前記(1)に記載の組成物。

(3) 更に、クロストリジウム・パーフリンジェンスで免疫された鶏の卵より得た抗体を含有する前記(1)又は(2)に記載の組成物。

(4) 鶏コクシジウム症の予防又は治療に用いられる前記(1)～(3)のいずれかに記載の組成物。

15 (5) 前記(1)～(4)のいずれかに記載の組成物を含有する鳥類用飼料。

(6) 前記(1)に記載の抗体、又は該抗体と、乳酸菌及び／又はクロストリジウム・パーフリンジェンスで免疫された鶏の卵より得た抗体とを鳥類に経口投与することを特徴とする鶏コクシジウム症の予防又は治療方法。

以下、本発明について詳細に説明する。

20 本発明は、抗原として、鶏コクシジウム症に関与する*Eimeria acervulina*、*Eimeria tenella*及び*Eimeria maxima*のスποロゾイト及びメロゾイトに共通の免疫原性を有する外膜蛋白質抗原又はその免疫原性断片を用いる。

前記抗原は、*Eimeria acervulina*、*Eimeria tenella*及び*Eimeria maxima*のス
ポロゾイト及びメロゾイトに共通の抗原であるため、病原体が*Eimeria*
25 *acervulina*、*Eimeria tenella*及び*Eimeria maxima*のいずれの場合にも有効に作用する。

前記抗原としては、例えば、*Avian Diseases*, 44: 379-389, 2000に記載の18～27キロダルトンの可溶性蛋白(F3)又は3-1E蛋白、*J. Parasitol.*, 84: 654-656, 1998に記載の21キロダルトンのメロゾイト蛋白、*Infection and Immunity*,

59: 1271-1277, 1991に記載の防御フラクシオン蛋白 (FV) を用いることができる。

「免疫原性断片」としては、1つ又はそれ以上のエピトープを含有し、免疫原として使用し得るものであれば、特に制限はない。

- 5 抗体は、3個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を認識できるとの報告 (F. Hudecz et al., J. Immunol. Methods, 147: 201-210 (1992)) があることから、前記免疫原性断片の最小単位としては、アミノ酸残基数3以上のペプチドが考えられ、好ましくはアミノ酸残基数5以上、更に好ましくはアミノ酸残基数10以上のペプチド又はポリペプチドが挙げられる。
- 10 また、前記の外膜蛋白質抗原又はその免疫原性断片は、液相法及び固相等のペプチド合成の方法により合成することもでき、更にペプチド自動合成装置を用いてもよく、日本生化学会編「生化学実験講座1 タンパク質の化学IV」, 東京化学同人, 1975年、泉屋ら「ペプチド合成の基礎と実験」, 丸善, 1985年、日本生化学会編「続生化学実験講座2 タンパク質の化学 下」, 東京化学
- 15 同人, 1987年等に記載された方法に従い合成することができる。

更に、前記の外膜蛋白質抗原又はその免疫原性断片は、対応する塩基配列を有するDNA又はRNAより遺伝子工学技術 (例えば、日本生化学会編「続生化学実験講座1 遺伝子研究法I」, 東京化学同人, 1986年、日本生化学会編「続生化学講座1 遺伝子研究法II」, 東京化学同人, 1986年、日本生化学会編「続生化学実験講座1 遺伝子研究法III」, 東京化学同人, 1987年参照) を用いて調製してもよい。

20

前記免疫原性断片が低分子物質の場合には、通常、該断片に担体を結合させたものを用いる。前記担体としては、スカシガイのヘモシアニン (KLH)、ウシ血清アルブミン (BSA)、ヒト血清アルブミン (HSA)、ニワトリ血清アルブミン、ポリ-L-リシン、ポリアラニルリシン、ジバルミチルリシン、破傷風トキソイド又は多糖類等を用いることができる。前記免疫原性断片と担体の結合には、グルタルアルデヒド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド法、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、ピスジアゾ化ペンジジン法、N-サクシミジル-3-(2-ピリジルジ

25

チオ) プロピオン酸法等の公知の方法を用いることができる。また、ニトロセル
ロース粒子、ポリビニルピロリドン、リポソーム等の担体に前記免疫原性断片を
吸着させたものを免疫原とすることもできる。

免疫方法は、免疫原（前記外膜蛋白質抗原又はその免疫原性断片）の皮下注射
5 や筋肉内注射、経口投与などが用いられる。接種免疫原量は蛋白質又はペプチド
として0.01～10mgが好適である。初回免疫から2～10週後に追加免疫
を行うことにより、より高い抗体価が得られる。追加免疫から2週間目以降には
鶏コクシジウム抗原に特異的に反応する抗体が、鶏の血清中のみならず卵にも生
成される。こうして免疫された抗体は、通常4ヶ月にわたって高い抗体価が維持
10 される。たとえ、抗体価が低下してきた場合でも、同様の手技で追加免疫を行え
ば高い抗体価が持続できる。この卵の抗体活性は、蛍光抗体法又は酵素抗体法に
よって測定できる。

前記免疫原は、アジュバントと混合して免疫注射することが好ましい。アジュ
バントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、
15 水酸化アルミニウムアジュバント、百日咳菌アジュバント等の公知のものを用い
ることができる。

前記のようにして得られた卵の抗体は全卵又は卵黄として溶液にして、又は噴
霧乾燥機等により乾燥し粉にして使用することができ、また全卵又は卵黄より脱
脂して卵水溶性蛋白質を使用することもでき、更に抗体を精製又は粗精製して用
20 いてもよい。

本発明の組成物は、鳥類、特に鶏に適用される。前記抗体の投与量は、一般に
は、1日当り1羽に対し抗体価で $1 \sim 10^6$ 倍であるが、鳥類の週齢、性別、品
種等により適宜増減することが好ましい。

また、前記抗体を投与するに際して、乳酸菌を併用すると、鶏コクシジウム症
25 に伴う体重減少等の症状がより改善される。乳酸菌は、通常、前記抗体1gに対
して乳酸菌 $10 \sim 10^9$ 個の割合で用いられる。乳酸菌は、前記抗体と同時に投
与してもよいし、間隔をおいて投与してもよい。

ここで使用される乳酸菌としては、ラクトバチルス、ビフィドバクテリウム、
ストレプトコッカス、エンテロコッカス、ラクトコッカスなどの属に属する乳酸

菌で種は問わず、単独又は複数株を混合してもよい。ラクトバチルス属に属する乳酸菌としては、例えば *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*、ビフィドバクテリウム属に属する乳酸菌としては、
5 例えば *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum*、ストレプトコッカス属に属する乳酸菌としては、例えば *Streptococcus agalactiae*, *S. salivarius*, *S. thermophilus*、エンテロコッカス属に属する乳酸菌としては、例えば *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*、ラクトコッカス属に属する乳酸菌としては、
10 例えば *Lactococcus lactis* が挙げられる。

また、前記抗体を投与するに際して、クロストリジウム・パーフリンジェンスで免疫された鶏の卵より得た抗体（以下「抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体」という。）を併用すると、鶏コクシジウム症に伴う体重減少等の症状がより改善される。抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体は、通常、
15 鶏コクシジウム症抗体 1 g に対して 0.01～100 g の割合で用いられる。抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体は、前記抗鶏コクシジウム症抗体と同時に投与してもよいし、間隔をおいて投与してもよい。

抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体は、免疫原としてクロストリジウム・パーフリンジェンスを用いる以外は、前記の抗鶏コクシジウム症抗体と同様の方法により調製することができる。また、免疫原としてクロストリジウム・パーフリンジェンスと、前記外膜蛋白質抗原又はその免疫原性断片とを同時に使用することにより、抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体及び抗鶏コクシジウム症抗体を同時に調製することもできる。

クロストリジウム・パーフリンジェンスとしては、例えば、*J. Anim. Sci.*, 75: 19-25, 1997に記載の蛋白、*Avian Diseases*, 21: 241-255, 1977に記載のトキシシン、*Vet. Rec.*, 120: 435-439, 1987に記載の蛋白、*Vaccine*, 11: 1253-1258, 1993に記載の蛋白、*FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 7: 321-336, 1993に記載の蛋白を抗原として用いることができる。

本発明の抗鶏コクシジウム症組成物は、各有効成分の濃度が 0.001%～1

0 %の溶液として、更に粉末、顆粒、錠剤又はペースト状で飼料に対して各有効成分の濃度が0.001 %～10 %の範囲で給与される。また、抗鶏コクシジウム症抗体の給与に際しては、胃での消化分解を防ぐために、腸溶性の剤形にしてもよい。

- 5 本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2002-189137号の明細書に記載された内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

[実施例1]

- 10 鶏コクシジウムのEimeria acervulina NA株 (PE0101)、Eimeria tenella NM株 (PE0102)、Eimeria maxima NT株 (PE0103) のオーシストを4週齢の鶏に各々 2×10^6 個経口感染させ、感染後4日目に剖検し、腸管及び腸管内容物を得た。各スポロゾイト及びメロゾイトの精製は、Avian Diseases, 39: 538-547, 1995にしたがって行った。Eimeria acervulina NA株のメロゾイトの可溶性外膜
- 15 蛋白質をSDS-PAGEで泳動することにより18～27 kDの外膜蛋白質を得た (Avian Diseases, 44: 379-389, 2000)。この外膜蛋白質0.5 mg/mlを含有する溶液とフロイント不完全アジュバントとを乳化し、12週齢の雌鶏に、左右の胸筋に1 mlずつ注射し1回目の免疫を行った。同様に、6週間後に2回目の免疫を同様に行った。2回目の免疫から2週間後、この鶏の血液中の抗
- 20 鶏コクシジウム症抗体の酵素抗体測定法 (ELISA) (Avian Diseases, 44: 379-389, 2000) による抗体価は、30,000～120,000倍であった。この鶏が産んだ卵の抗体価は30,000～120,000倍であった。この抗体価は4ヶ月間持続した。この卵を集め、噴霧乾燥により全卵粉末の鶏卵抗体を作成した。この粉末の抗体価は60,000倍であった。また、本抗体のスポロゾイト及びメロゾイトに対する交差
- 25 性を間接免疫蛍光染色 (Avian Diseases, 44: 379-389, 2000) で検討した結果、本抗体はアイメリア属のEimeria acervulina、Eimeria tenella、Eimeria maximaのスポロゾイト及びメロゾイトの表面を特異的に蛍光染色し、共通の抗体であることが確認できた。

[実施例2]

実施例 1 で得た抗鶏コクシジウム症抗体をブロイラーの飼料に添加して鶏コクシジウム症実験感染鶏 (*Eimeria tenella*) (Avian Disease, 31: 112-119, 1987) に対する効果を検討した。供試動物はブロイラー専用種チャンキーとし、抗体はブロイラー肥育前期用標準飼料 (SDB No. 1: 財団法人畜産生物安全研究所) に 0.1%、1% 及び 10% となるように添加して投与した。5 *Eimeria tenella* ET株のオーシスト感染は 1000 個/羽 (J. Protozool, 9: 154-161, 1962) とし、各群 10 羽ずつ割付け設定した。また感染後の観察期間は、2 週間とした。検査項目は、増体量及び飼料要求率を主な検査項目とし、その他に O. P. G. (Oocysts Per Gram of faeces) 及び盲腸病変観察を実施した (角田清監修「鶏コクシジウム症」、チクサン出版社、1983年)。その結果、増体量で 0.1% 投与群でも効果が確認され、飼料要求率では 1.0% 投与で効果が確認された。10

以上のことから、鶏コクシジウム症の攻撃に対して抗鶏コクシジウム症抗体を飼料に 0.1% 以上投与することにより増体量及び飼料要求率を含めた改善が認められた。総合判定は、得られた各観察項目の数値を元に被験物質の効果を判定し、極めて有効な効果が得られた。15

表 1

	非感染群	<i>E. tenella</i> 感染群			
	非添加群	飼料に添加した抗体の割合			
	0%	0%	0.1%	1%	10%
平均増体量 (g)	731	578	622	620	666
相対増体率 (%) ^{a)}	100	79	85	85	91
平均飼料摂取量 (g)	879	885	910	862	915
飼料要求率 ^{b)}	1.20	1.53	1.46	1.39	1.37
生存率 (%)	100	100	100	100	100
OPG (x10 ⁴) 7日目	0.0	9.7	5.1	4.2	0.4
オーシスト値 ^{c)}	0	40	20	10	5
盲腸病変値 ^{d)}	0	20	10	5	5
ACI値 ^{e)}	200	119	155	170	181
			少し有効	中程度有効	極めて有効

a) : 相対増体率 (%) = 感染群の増体率 ÷ 非感染群の増体率 × 100

b) : 飼料要求率 = 平均飼料摂取量 ÷ 平均増体量

c) : 対照群に対する O. P. G. の割合 = 投薬群の O. P. G. ÷ 感染無投薬対照群の O. P. G.

5 × 100 より、基準を元に各試験群のオーシスト値を求めた。0 : 0 ~ 1%、+5 : 1.1 ~ 25%、+10 : 26 ~ 50%、+20 : 51 ~ 75%、+40 : 76 ~ 100%。

d) : 盲腸病変値は、0 : 病変認められず ; +1 : 盲腸壁に極めて少数の点状出血斑が散在しているが、内容物は正常である ; +2 : 内容物にわずかな血液を混じり、多数の出血病巣が見られる ; +3 : 多量の血液、あるいは盲腸コア（凝血または
10 灰白色チーズ状、バナナ型の塊）を盲腸内に含み、盲腸壁の肥厚、および盲腸の変形、萎縮が明瞭である ; +4 : 盲腸は著しく萎縮し、病変は直腸部まで達する。壁は極度に肥厚し、盲腸内には凝血あるいは盲腸コアを含んでいる ; の判定基準にしたがって 1 羽平均値を求め、10 羽に換算した値を表 1 に示した。

e) : ACI 値 (Anticoccidial Index : 抗鶏コクシジウム指数) =

15 (相対増体率 + 生存率) - (オーシスト値 + 病変値)

ACI 値 : 180 以上…極めて有効、160 ~ 179…中程度有効、

120 ~ 161…少し有効、120 未満…効力なし

[実施例 3]

実施例 1 で得た抗鶏コクシジウム症抗体と乳酸菌のラクトバチルス・アシドフ
20 イルスを混合した飼料を用いて鶏コクシジウム症実験感染鶏 (*Eimeria tenella*) に対する効果を検討した。乳酸菌のラクトバチルス・アシドフィルス ATCC4356 株は MRS 培地で培養後、凍結乾燥により 1×10^{11} 個/g の粉末を作製した。供試動物はブロイラー専用種チャンキーとし、ブロイラー肥育前期用標準飼料 (SDB No. 1) に前記抗体 0.1% と乳酸菌 10^6 個/g を添加して投与した。

25 *Eimeria tenella* ET 株のオーシスト感染は 1000 個/羽とし、各群 10 羽ずつ割付け設定した。また感染後の観察期間は、2 週間とした。検査項目は、増体量及び飼料要求率を主な検査項目とし、その他に O. P. G. 及び盲腸病変観察を実施した。その結果、増体量で抗体と乳酸菌の投与群で効果が確認され、飼料要求率でも効果が確認された。

以上のことから、鶏コクシジウム症の攻撃に対して抗鶏コクシジウム症抗体と乳酸菌のラクトバチルス・アシドフィルスを飼料に投与することにより増体量及び飼料要求率を含めた改善が認められた。総合判定は、得られた各観察項目の数値を元に被験物質の効果を判定したところ、極めて有効な効果が認められた。

表 2

	非感染群	<i>E. tenella</i> 感染群		
	非添加群	飼料に添加		
	対照群	対照群	抗体0.1%	抗体+乳酸菌
平均増体量 (g)	731	578	622	666
相対増体率 (%)	100	79	85	91
平均飼料摂取量 (g)	879	885	910	845
飼料要求率	1.20	1.53	1.46	1.27
生存率 (%)	100	100	100	100
OPG ($\times 10^4$) 7日目	0.0	9.7	5.1	2.2
オーシスト値	0	40	20	5
盲腸病変値	0	20	10	5
ACI値	200	119	155	181
			少し有効	極めて有効

[実施例 4]

実施例 1 で得た抗鶏コクシジウム症抗体とクロストリジウム・パーフリンジェンスで免疫された鶏の卵より得た抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体を混合した飼料を用いて鶏コクシジウム症 (*Eimeria tenella*) とクロストリジウム・パーフリンジェンスの混合感染実験鶏 (Avian Disease, 24: 324-333, 1980) に対する効果を検討した。

抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体は、クロストリジウム・パーフリンジェンスATCC3624株をチオグリコレート培地で培養し、この 1×10^{10} 個 / ml を含有する菌液とフロイント不完全アジュバントとを乳化し、12週齢の雌鶏に、左右の胸筋に 1 ml ずつ注射し1回目の免疫を行った。同様に、6週間後に2回目の免疫を同様に行った。2回目の免疫から2週間後、この鶏の血液中の抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体の菌体凝集反応法による抗体価は、300～1200倍であった。この鶏が産んだ卵の抗体価は300～1

200倍であった。この抗体価は4ヶ月間持続した。この卵を集め、噴霧乾燥により全卵粉末の鶏卵抗体を作成した。この粉末の抗体価は600倍であった。

供試動物はブロイラー専用種チャンキーとし、ブロイラー肥育前期用標準飼料(SDB No. 1)に抗鶏コクシジウム症抗体0.1%と抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体0.1%を添加して投与した。Eimeria tenella ET株のオーシスト感染は1000個/羽とし、クロストリジウム・パーフリンジェンスATCC3624株の感染は 10^7 個/羽とし、各群10羽ずつ割付け設定した。また感染後の観察期間は、2週間とした。検査項目は、増体量及び飼料要求率を主な検査項目とし、その他にO. P. G. 及び盲腸病変観察を実施した。その結果、増体量で抗鶏コクシジウム症抗体と抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体の混合投与群で効果が確認され、飼料要求率でも効果が確認された。

以上のことから、鶏コクシジウム症とクロストリジウム・パーフリンジェンスの混合攻撃に対して抗鶏コクシジウム症抗体0.1%と抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体0.1%を飼料に併用して投与することにより増体量及び飼料要求率を含めた改善が認められた。総合判定は、得られた各観察項目の数値を元に被験物質の効果を判定したところ、極めて有効な効果が認められた。

表 3

	非感染群	<i>E. tenella</i> + クロストリジウム混合感染群		
	非添加群	飼料に添加		
	対照群	対照群	鶏コクシジウム症抗体0.1%	鶏コクシジウム症抗体0.1% + クロストリジウム抗体0.1%
平均増体量 (g)	731	563	620	629
相対増体率 (%)	100	77	85	86
平均飼料摂取量 (g)	879	880	905	865
飼料要求率	1.20	1.56	1.46	1.38
生存率 (%)	100	100	100	100
OPG ($\times 10^4$) 7日目	0.0	12.0	6.3	0.1
オーシスト値	0	40	20	0
盲腸病変値	0	24	12	3
ACI値	200	113	153	183
			少し有効	極めて有効

[実施例 5]

実施例 1 で得た抗鶏コクシジウム症抗体を飼料に添加して鶏コクシジウム実験感染鶏 (*Eimeria acervulina*) (Avian Disease, 31: 112-119, 1987) に対する効果を検討した。供試動物はブロイラー専用種チャンキーとし、抗体はブロイラー肥育前期用標準飼料 (SDB No. 1) に 0.1%、1% 及び 10% となるように添加して投与した。*Eimeria acervulina* EA 株のオーシスト感染は 1000 個/羽とし、各群 10 羽ずつ割付けた。また感染後の観察期間は、2 週間とした。検査項目は、増体量及び飼料要求率を主な検査項目とし、その他に O. P. G. 及び小腸病変観察を実施した。その結果、増体量で 0.1% 投与群でも効果が確認された。

10 以上のことから、鶏コクシジウム症の攻撃に対して抗鶏コクシジウム症抗体を飼料に 0.1% 以上投与することにより増体量の改善が認められた。

表 4

	非感染群	<i>E. acervulina</i> 感染群			
	非添加群	飼料に添加した抗体の割合			
	0%	0%	0.1%	1%	10%
平均増体量 (g)	731	580	630	650	680
相対増体率 (%)	100	79	86	89	93
平均飼料摂取量 (g)	879	826	869	845	820
飼料要求率	1.20	1.4	1.38	1.30	1.22
生存率 (%)	100	100	100	100	100
OPG (x10 ⁴) 7日目	0.0	5.0	4.5	4.0	0.3
オーシスト値	0	40	40	40	5
小腸病変値 ^{a)}	0	20	5	5	0
ACI 値	200	119	141	144	188
			少し有効	少し有効	極めて有効

15 a) : 小腸病変値は、0 : 病変認められず ; +1 : 十二指腸にオーシストを含んだ白色壊死病巣が散在してみられる ; +2 : 白色壊死病巣の数が増加し、かつ小腸上部にまで病巣が延長する ; +3 : 病巣は増加し融合する。小腸壁は肥厚し、内容物は水様である ; +4 : お互いに融合した多数の病巣により、十二指腸ならびに小腸上部は灰色を呈する。壁は強度に肥厚し、クリーム状の粘液を内部に含む ; の判定

基準にしたがって1羽平均値を求め、10羽に換算した値を表4に示した。

実施例2、3及び5において、抗鶏コクシジウム症抗体、又は該抗体と乳酸菌を鶏に対して飼料に混ぜて連続して給与したとき、鶏コクシジウム症実験感染させたところ発症が軽減され、増体効果が見られた。また、鶏コクシジウム症に感
5 染した鶏に抗鶏コクシジウム症抗体と乳酸菌を飼料に混合して給与したとき、その症状は著しく改善され、増体量及び飼料要求率を含めた改善が認められた。また、抗クロストリジウム・パーフリンジエンス抗体を併用すると鶏コクシジウム症の発症を予防し、増体量及び飼料要求率を含めた改善が認められた。

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中
10 にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

本発明における抗鶏コクシジウム症抗体と乳酸菌又は抗クロストリジウム・パーフリンジエンス抗体から成る抗鶏コクシジウム症組成物は、鶏コクシジウムに
15 対して特異的に作用するので、抗鶏コクシジウム剤又はワクチンの代わりに鶏コクシジウム症に対して極めて有効な予防効果を発揮するとともに、鶏コクシジウム症の症状軽減及び体重増加に極めて有効に働く。

請 求 の 範 囲

1. 鶏コクシジウム症に関与する*Eimeria acervulina*、*Eimeria tenella*及び
*Eimeria maxima*のスポロゾイト及びメロゾイトに共通の免疫原性を有する外膜蛋
5 白質抗原又はその免疫原性断片で免疫された鶏の卵より得られた抗体を含有する
経口用抗鶏コクシジウム症組成物。
2. 更に、乳酸菌を含有する請求の範囲第1項記載の組成物。
3. 更に、クロストリジウム・パーフリンジェンスで免疫された鶏の卵より得た
抗体を含有する請求の範囲第1項記載の組成物。
- 10 4. 鶏コクシジウム症の予防又は治療に用いられる請求の範囲第1項記載の組成
物。
5. 請求の範囲第1項記載の組成物を含有する鳥類用飼料。
6. 請求の範囲第1項記載の抗体、又は該抗体と、乳酸菌及び／又はクロストリ
ジウム・パーフリンジェンスで免疫された鶏の卵より得た抗体とを鳥類に経口投
15 与することを特徴とする鶏コクシジウム症の予防又は治療方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08132

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K39/395, 35/74, A61P33/02, A23k1/18, 1/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K39/395, 35/74, A61P33/02, A23k1/18, 1/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 164176 A2 (SOLVAY & CLE), 11 December, 1985 (11.12.85), Full text; particularly, Claims 34 to 36; example 8 & JP 61-069798 A & DE 3586609 A & AU 8543329 A & IL 75455 A	1-6
Y	JP 62-215534 A (FORVEST LTD.), 22 September, 1987 (22.09.87), Full text; particularly, Claims; page 3, upper right column, line 17 to lower left column, line 8 & EP 225254 A2 & US 5080895 A & DE 3689717 A	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 07 August, 2003 (07.08.03)	Date of mailing of the international search report 26 August, 2003 (26.08.03)
---	--

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08132

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2615673 B (Kabushiki Kaisha Ghen Corp.), 11 March, 1997 (11.03.97), Full text (Family: none)	1-6
Y	EP 344808 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.), 06 December, 1989 (06.12.89), Full text & JP 03-007594 A & DE 68921923 A & CN 1038837 A & KR 156545 B	1-6
Y	EP 135073 A2 (AMERICAN CYANAMID CO.), 27 March, 1985 (27.03.85), Full text & JP 60-072827 A & AU 8431333 A & IL 72629 A & CA 1261286 A	1-6
Y	EP 439056 A2 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.), 31 July, 1991 (31.07.91), Full text & JP 2000-139483 A & DE 69101646 A & AU 9169952 A & CA 2034768 A & KR 197455 B	1-6
Y	JP 10-182483 A (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 07 July, 1998 (07.07.98), Full text (Family: none)	1-6
Y	JP 08-040935 A (Nisshin Flour Milling Co., Ltd.), 13 February, 1996 (13.02.96), Par. No. [0039] (Family: none)	2,3,6
Y	JP 07-255386 A (Chubu Shiryo Co., Ltd.), 09 October, 1995 (09.10.95), Page 4, right column, lines 17 to 21 (Family: none)	2,3,6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K39/395, 35/74, A61P33/02, A23K1/18, 1/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K39/395, 35/74, A61P33/02, A23K1/18, 1/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	EP 164176 A2 (SOLVAY & CLE) 1985.12.11 全文、特に請求項34~36、実施例8参照 &JP 61-069798 A &DE 3586609 A &AU 8543329 A &IL 75455 A	1-6
Y	JP 62-215534 A (フォーベスト有限株式会社) 1987.09.22 全文、特に特許請求の範囲、及び第3頁右上欄第17行~左下欄 第8行参照 &EP 225254 A2 &US 5080895 A &DE 3689717 A	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.08.03

国際調査報告の発送日

26.08.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

榎本 佳予子

4P

9638

電話番号 03-3581-1101 内線 3492



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2615673 B (株式会社ゲン・コーポレーション) 1997.03.11 全文参照 (ファミリーなし)	1-6
Y	EP 344808 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 1989.12.06 全文参照 &JP 03-007594 A &DE 68921923 A &CN 1038837 A &KR 156545 B	1-6
Y	EP 135073 A2 (AMERICAN CYANAMID COMPANY) 1985.03.27 全文参照 &JP 60-072827 A &AU 8431333 A &IL 72629 A &CA 1261286 A	1-6
Y	EP 439056 A2 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 1991.07.31 全文参照 &JP 2000-139483 A &DE 69101646 A &AU 9169952 A &CA 2034768 A &KR 197455 B	1-6
Y	JP 10-182483 A (住友製薬株式会社) 1998.07.07 全文参照 (ファミリーなし)	1-6
Y	JP 08-040935 A (日清製粉株式会社) 1996.02.13 【0039】 (ファミリーなし)	2, 3, 6
Y	JP 07-255386 A (中部飼料株式会社) 1995.10.09 第4頁右欄第17～21行 (ファミリーなし)	2, 3, 6